

【KOD One[®] PCR Master Mix/-Blue-トラブルシューティング】

問題	対策	具体例・目安	
増幅産物が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 10~30 sec./ kb に延長する。	
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。	
		3 ステップサイクルでアニーリング温度を Tm-7~Tm-10°C に下げる。	
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する。	テンプレートの量を増やす。	
		阻害物質の影響を減らすため、テンプレート量を減らす。	
		テンプレートの調製法を検討する。	
		テンプレートを精製する。	
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	RNA を分解もしくは除去する。	
		プライマー濃度を 0.3 μM から 0.15 μM (終濃度) に下げる (特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。	
		プライマー濃度を 0.3 μM から 0.5 μM や 1.0 μM (終濃度) に上げる (特に低コピーからの検出で有効な場合がある)。	
		プライマーを再調製、再合成する。	
	スメア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	プライマーを再設計する。
3 ステップサイクルで行っている場合、アニーリング温度を上げる。もしくは 2 ステップサイクルに変更する。			
2 ステップサイクルで行っている場合、伸長温度を 72°C にする。もしくはステップダウンのサイクルで行う。			
使用しているテンプレートの量を確認する。		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。	
		テンプレートの量を減らす。	
使用しているプライマーの品質を確認する。		プライマーを再調製、再合成する。	
		プライマーを再設計する (長めのプライマーを設計するとスメア、エキストラバンドが解消する場合がある)。	
TA クローニングができない。		専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TArget Clone [™] -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いる。 (KOD One [®] PCR Master Mix / KOD One [®] PCR Master Mix -Blue- の増幅産物の末端は平滑化されています。)